

令和元年6月12日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：15K11021

研究課題名(和文) 口腔癌進展におけるpodoplanin陽性癌関連線維芽細胞(CAF)の意義

研究課題名(英文) Significance of podoplanin positive CAF in oral cancer

研究代表者

徳永 八ルミ(井上八ルミ)(Tokunaga (Inoue), Harumi)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：20711047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌を取り巻く微小環境の中心的役割である癌関連線維芽細胞(CAF)におけるpodoplanin発現の意義と分子的メカニズムを明らかにすることを目的に、正常歯肉線維芽細胞株(HGF)におけるpodoplanin発現動態とCAFにおけるpodoplanin発現シグナル伝達機構の検索について研究を進めた。その結果、podoplaninは腫瘍細胞のみならず、癌進展の先端部における線維芽細胞においても発現する、その線維芽細胞は α -SMA、FAP とともに陽性反応を示すことからCAFと考えることができる、そしてCAFはTGF- β 1依存性に癌細胞が進展しやすい環境を整えるということが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における口腔癌の罹患数は全癌の中での割合は低いものの、人口の高齢化に伴い口腔癌罹患数は増加しつつあることが知られている。また、最近において口内炎を放置した結果口腔扁平上皮癌が急速に進行したというケースがたびたびニュースなどで報道され、口腔癌に対する国民の関心が高まっている状況にある。このような中で、口腔癌の発生、進展に関する基礎研究は国民の期待に沿うものと確信する。

研究成果の概要(英文)：Cancer-associated fibroblast (CAF) within the cancer microenvironment is now shown to have a critical role in cancer cell invasion and metastasis. In order to clarify the significance of podoplanin expression in CAF of oral squamous cell carcinoma, human gingival fibroblasts (HGFs) were cultured with oral squamous cell supernatant liquid and examined podoplanin expression associated with the growth factor such as TGF- β 1 and with podoplanin signaling pathway. As a result, podoplanin was expressed not only in the tumor cells, but also the fibroblasts at the invasive front of oral cancer. These fibroblasts were positive for α -SMA and FAP, so that they were considered as CAFs. Normal gingival fibroblasts were morphologically and functionally changed to CAFs upon TGF- β 1 stimulation in dependent manner.

研究分野：口腔癌

キーワード：癌関連線維芽細胞(CAF) podoplanin 口腔扁平上皮癌 FAP α -SMA TGF- β 1 正常歯肉線維芽細胞(HGF) initial education

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 固形癌においては、増殖の主体は実質である癌細胞であり、間質(基質)は実質を支持する血管結合組織からなるとされるが、近年、間質にある癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast :CAF)が癌進展に重要な作用を及ぼすことが頭頸部領域を含めて報告されている。このような背景のもと、申請者らは podoplanin が腫瘍の浸潤・転移に関連するという点に着目し、口腔癌の癌細胞および CAF における podoplanin 発現動態に関する研究を推し進めてきた。Podoplanin は正常細胞では、細胞形態の維持や細胞収縮に関連するとされる一方で、悪性腫瘍においては、種々の癌における腫瘍先進部での発現亢進が悪性度に関与している。さらに、最近になって、肺腺癌、肺扁平上皮癌、乳癌、食道癌、大腸癌においては、CAF における podoplanin 発現がその予後を左右するという in vivo の報告が相次いでいるが、その分子的发現メカニズムは不明のままであり、解明が期待される。

(2) 申請者らは、良性腫瘍でありながら局所侵襲性を示す多形腺腫における類上皮細胞型および紡錘細胞型、エナメル上皮腫、角化嚢胞性歯原性腫瘍(歯原性角化嚢胞 WHO2017 改訂)、石灰化嚢胞性歯原性腫瘍(石灰化歯原性嚢胞 WHO2017 改訂) などにおける podoplanin の局在意義について報告している。口腔癌においては、申請者らは上皮異形成-扁平上皮癌モデル(dysplasia-carcinoma sequence)における、上皮性異形成の程度および扁平上皮癌での分化度と podoplanin 発現の相関性を見だし、本タンパク質の発現が癌の進展に関与する知見を得ている。さらに、申請者らは、口腔癌由来株において podoplanin 依存性に癌細胞の移動能が促進することを示し、口腔癌進展の1つの経路として EGF-Src-Cas-Podoplanin pathway の可能性も示した。一方、口腔癌における CAF と podoplanin 発現の関連については申請者が最初に報告している。原発巣、転移巣ともに、podoplanin 陽性を示す線維芽細胞の多くに筋線維芽細胞のマーカーである α -smooth muscle actin (α -SMA) が陽性反応を示し、その両者の陽性反応の強度に相関関係を認め、podoplanin 陽性 CAF は、筋線維芽細胞として癌を進展させる促進力を担っている可能性を示唆した。

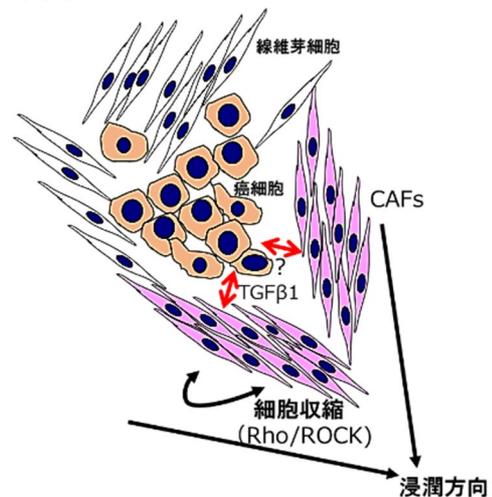
本研究計画は podoplanin の未だ解明されていない基礎研究を遂行し、podoplanin を利用した診断方法や治療薬への臨床応用に展開するための基盤研究を行う。

2. 研究の目的

申請者は最近、口腔癌における癌関連線維芽細胞(CAF:cancer-associated fibroblast)の podoplanin 発現が癌進展に関与することを見いだした。癌細胞を取り巻く微小環境の中の線維芽細胞が癌細胞の分泌するもの(TGF- β 1などの各種因子)に影響を受け、形態学的にも機能的にも変化し、その結果、癌の進展を促すのではないかと考えた(図1)。

本研究の目的は、CAF における podoplanin 発現の意義とその分子的发現メカニズムを明らかにし、口腔癌治療に繋がる知見を得ようとするものである。具体的には、口腔癌由来株上清+正常歯肉線維芽細胞株における podoplanin 発現動態の検索、口腔癌由来株における増殖因子刺激による podoplanin 発現動態の検索、口腔癌由来株上清+正常歯肉線維芽細胞株における増殖因子刺激による podoplanin 発現シグナル伝達機構の検索、の3つである。

図1 癌細胞とCAFの相互作用



3. 研究の方法

この研究計画では、癌細胞と癌細胞を支持する微小環境の相互作用という観点に着目し、podoplanin 発現の分子病理学的検索を行い、口腔癌の癌進展のメカニズムを明らかにする。

研究計画の進め方として、

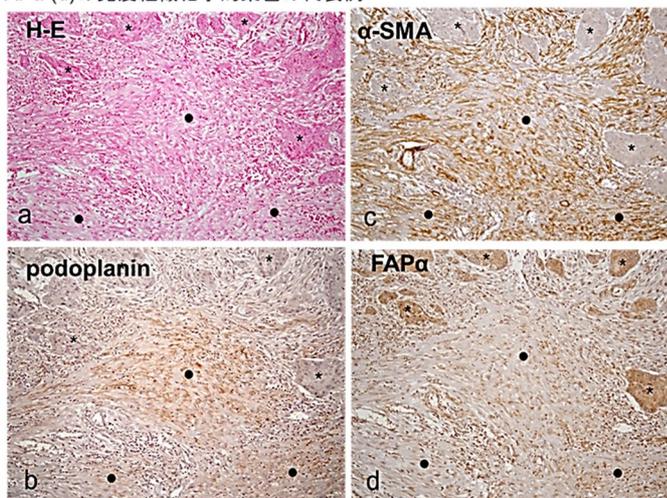
- (1) 口腔癌由来株における podoplanin 発現の動態を調べる
- (2) 口腔癌由来株における podoplanin 発現のシグナル伝達を解明する
- (3) 正常歯肉線維芽細胞と癌細胞の相互作用における podoplanin 発現の動態を明らかにする
- (4) CAF における podoplanin 発現のシグナル伝達機構を探索する
- (5) 口腔癌由来株における Matrix metalloproteinases (MMPs) と podoplanin 発現の関係を調べ、上皮間葉転換:epithelial-mesenchymal transition (EMT) との関連を検索するという5つを計画した。

4. 研究成果

(1) 本研究の目的は、腫瘍細胞よりもその周囲を取り巻く微小環境の代表格である癌関連線維芽細胞(CAF)に焦点を当てている。分子病理学的検索が研究方法のほとんどを占めていたが、実験を進めるにつれ、CAF の定義そのものを今一度再検討する必要があると考えた。慣例的に、癌の腫瘍細胞の先進部の線維芽細胞が CAF であるとする根拠を「 α -SMA に陽性となる線維芽細胞

胞」としてきたが、 α -SMA 以外に CAF である指標を用いるべきではないかとの議論から、CAF に発現する生理活性物質の1つとして知られており、癌の発育に有利な微小環境を形成すると推測されている fibroblast activation protein (FAP) を CAF のマーカーとして追加し、podoplanin 陽性線維芽細胞の α -SMA および FAP の発現動態を、薄切した標本を用いて免疫組織化学的染色法によりクロス検索することとした。検索対象は扁平上皮癌と診断された原発巣 55 例と転移巣 6 例とした。その結果、podoplanin 陽性線維芽細胞で 80% が α -SMA 陽性、75% が FAP 陽性となり(図2) 原発巣と転移巣を比較検討してみた結果、 α -SMA、FAP とともに染色強度が増強していることがわかった。以上より、in vivo で「podoplanin 陽性線維芽細胞は CAF であり、癌の進展に関与する」という可能性に矛盾はないと考えるに至った。

図2 癌巣(*)の周囲の線維芽細胞(●)におけるpodoplanin (b), α -SMA (c), FAP α (d)の免疫組織化学的染色の代表例

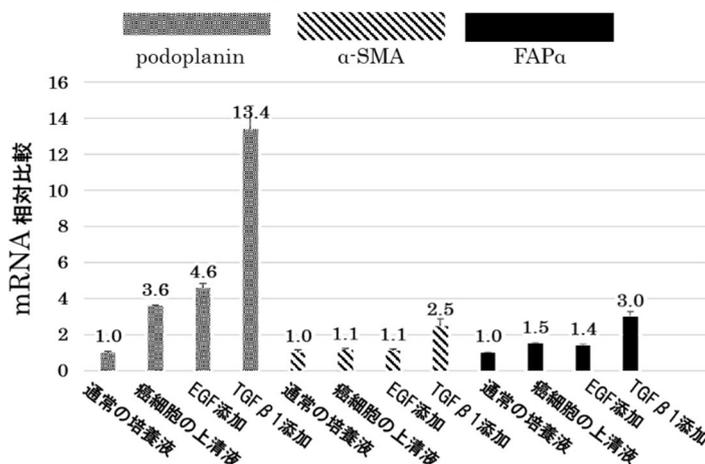


(2) 口腔癌由来株における podoplanin、 α -SMA および FAP 発現動態を検索した結果、podoplanin は EGF、TGF β 1 による発現増強が、FAP は TGF β 1 による顕著な発現亢進が確認できた。 α -SMA に関しては、ほぼ発現が減弱された。この結果は、口腔癌の腫瘍細胞において、EGF だけではなく TGF β 1 刺激下でも podoplanin 発現が亢進されること、また、TGF β 1 については、podoplanin だけではなく、FAP も著しく亢進していることから、次の CAF における両タンパク質の発現動態を検索する上でも貴重なデータとなった。

(3) 次に、正常歯肉線維芽細胞(HGF)と癌細胞の相互作用における podoplanin 発現の動態を明らかにした。HGF を口腔癌細胞株の上清液で培養した結果、podoplanin および FAP については発現亢進が確認された一方で、 α -SMA については減弱した結果となり、その旨を平成 29 年度の報告書で報告したが、その後実験方法を試行錯誤した結果、 α -SMA において発現が減弱することはなく、vivo の実験結果と矛盾しない結果となった(図3) 通常の培養液と比較して、癌細胞株の上清液を混ぜて HGF を培養すると podoplanin mRNA の発現が亢進されるという結果は、図1で示した模式図のように、癌の腫瘍細胞が分泌する何らかの因子が、周囲の線維芽細胞に形態学的にも機能的にも影響を与え、それが CAF として腫瘍をさらに進展させるという当初の仮説を裏付けるものとなった。

本研究の要でもあった HGF の取り扱いについては、想定している以上に苦勞を要した。癌細胞と異なり、正常の歯肉線維芽細胞のため継代数が限られたことに加えて、口腔癌細胞株の上清で培養する際に癌細胞の分泌物により HGF が死滅したり、必要最低量の mRNA およびタンパク質の確保に難儀だったりとなかなか思うように実験が捗らなかった。2018 年度の口腔病理学会にて発表した際に、癌細胞株の上清液の濃度について貴重な意見をもらうことができ、それ以降、癌細胞株の上清液と HGF のためのメーカー指定の培養液の比率を 1 : 2 とすることで実験に再現性が得られ、上記の結果に至った。以降、HGF を使用する際の培養液は、メーカー指定の培養液を使用するとともに、癌細胞株の上清は培養期間 3 日間のものを使用し、メーカー指定の培養液との比率を 1 : 2 とすることとした。

図3 HGFにおけるpodoplanin, α -SMA, FAP α のmRNA発現の比較



(4) 次に、CAF における podoplanin 発現シグナル伝達機構の検索を行った。まず、podoplanin、 α -SMA、FAP とともに TGF β 1 刺激による線維芽細胞の発現の亢進を確認した。特に興味深いのが podoplanin 発現の顕著な亢進である(図3)。このことから、podoplanin は癌進展のマーカーとして CAF においても有益であることが示され、その鍵は TGF β 1 を介したシグナル伝達機構であることが分かってきた。

それを受け、TGF- β 1の中和抗体である1D11で処理してpodoplaninのタンパクレベルでの発現動態を検索したところ、いくつかの癌細胞株の上清液で培養したHGFでpodoplaninの発現が抑制された。以上のことから、CAFにおけるpodoplanin発現はTGF- β 1依存性に癌の進展に寄与する可能性が示された。

(5) 以上のことから、podoplaninは腫瘍細胞のみならず、癌進展の先端部における線維芽細胞においても発現する、その線維芽細胞は α -SMA、FAPともに陽性反応を示すことからCAFと考えることができる、そしてCAFはTGF- β 1依存性に癌細胞が進展しやすい環境を整えるということが示唆された。

(6) CAFの由来は固有の線維芽細胞であり、癌細胞が分泌するTGF- β 1などの因子に初めて暴露されると線維芽細胞はまず教育を受け、筋線維芽細胞としての性格をもつようになるという、initial education of fibroblastが考えられる。癌細胞の周囲にある固有の線維芽細胞は、CAFとして形態を変えるだけではなく、RhoAを介し細胞骨格のアクチンファイバーを重合または切断することで細胞の移動能を亢進し、癌の進展に関与している可能性が考えられる。本研究では、当初予定していた口腔癌細胞株によるシグナル伝達経路の探索やMMPによる上皮間葉転換(EMT)機構の解明について研究を進めることができなかったが、今後はアクチンファイバーの構成成分であるcofilinや微小管の調整を担っているmDiaといったタンパク質とpodoplaninの相互作用機構について検索を進め、更なる癌の進展機構について解明していきたいと考える。

<引用文献>

- Costea DE et al., Identification of two distinct carcinoma-associated fibroblast subtypes with differential tumor-promoting abilities in oral squamous cell carcinoma., *Cancer Res.*, 73(13), 3888-3901, 2013
- Oku Y et al., Podoplanin expression in human pleomorphic adenomas., *Oral Oncology*, Ocean Papers & Printers, 251-253, 2008
- González-Alva et al., Enhanced expression of podoplanin in ameloblastomas., *J Oral Pathol Med.*, 39(1), 103-109, 2010
- Okamoto E et al., Significance of podoplanin expression in keratocystic odontogenic tumor., *J Oral Pathol Med.*, 39(1), 110-114, 2010
- Kikuchi K, Inoue H et al., Immunohistochemical expression of podoplanin in so-called hard keratin-expressing tumors, including calcifying cystic odontogenic tumor, craniopharyngioma, and pilomatrixoma., *J Oral Sci.*, 54(2), 165-175, 2012
- Inoue H et al., Podoplanin expression during dysplasia-carcinoma sequence in the oral cavity., *Tumour Biol.*, 33(1), 183-194, 2012
- Inoue H et al., Podoplanin promotes cell migration via the EGF-Src-Cas pathway in oral squamous cell carcinoma cell lines., *J Oral Sci.*, 54(3), 241-250, 2012
- Inoue H et al., Podoplanin expressing cancer-associated fibroblasts in oral cancer., *Tumor Biol.*, 35(11), 11345-11352, 2014
- Nurmik M et al., In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers., *Int J Cancer.*, doi: 10.1002/ijc.32193, 2019
- Martín-Villar E et al., Podoplanin mediates ECM degradation by squamous carcinoma cells through control of invadopodia stability., *Oncogene.*, 34(34), 4531-4544, 2015
- Lash LL et al., Small-molecule intramimics of formin autoinhibition: a new strategy to target the cytoskeletal remodeling machinery in cancer cells., *Cancer Res.*, 73(22), 6793-6803, 2013

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Kaoru Kusama, Harumi Inoue, Yuji Miyazaki, Kentaro Kikuchi, Hideaki Sakashita, Kuniyasu Ochiai, *Microorganisms and cancer of the oral cavity*, *Integrative Cancer Science and Therapeutics.*, 査読有、Vol.3(4), 2016, pp.510-515
DOI:10.15761/ICST.1000200

[学会発表](計1件)

井上ハルミ、金田朋久、星野都、宮崎裕司、菊池建太郎、坂下英明、草間薫、口腔癌における癌関連線維芽細胞(CAF)のpodoplanin発現の意義、第29回日本臨床口腔病理学会総会/第11回日本口腔検査学会総会(東京)、2018年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：草間 薫

ローマ字氏名：KUSAMA, kaoru

所属研究機関名：明海大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 20130479

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。